

# 地中海实蝇及其近缘种基因芯片检测研究

李文芬<sup>1</sup>, 余道坚<sup>2,\*</sup>, 颜亨梅<sup>1</sup>, 李建光<sup>3</sup>, 徐浪<sup>2</sup>, 任鲁凤<sup>4</sup>

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081; 2. 深圳出入境检验检疫局 广东深圳 518001;

3. 北京出入境检验检疫局 北京 100026; 4. 本元正阳基因技术有限公司 北京 100176)

**摘要**: 本研究选择线粒体 DNA (mtDNA) 细胞色素氧化酶 I 基因 (CO I) 为分子标记基因, 以双翅目实蝇科昆虫 DNA 序列为目标, 建立了我国进境植物检疫害虫地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、芒果小条实蝇 *C. cosyra* 和纳塔尔小条实蝇 *C. rosa* 等生物芯片检测方法。地中海实蝇及其近缘种检测芯片由检测探针 (实蝇科通用探针 1 条, 小条实蝇属通用探针 1 条, 地中海实蝇、芒果小条实蝇和纳塔尔小条实蝇近缘种探针 2 条和种特异探针 4 条)、质控探针 (定位点探针、阳性质控、阴性质控和空白对照探针各 1 条) 组成。芯片检测结果表明, 检测探针特异性强, 能实现上述 3 种实蝇的种类快速区分和准确鉴定; 检测方法稳定性好, 地中海实蝇不同虫态 (卵、幼虫、蛹和成虫) 和不同地理种群检测结果完全一致。地中海实蝇生物芯片检测技术将为我国进口果蔬中检疫性实蝇快速筛查和种类鉴定提供检测方法, 同时, 还可应用到其他属的实蝇以及相关害虫的检疫中, 为有害生物的快速鉴定提供了新方法。

**关键词**: 实蝇科; 近缘种; 基因芯片; 分类鉴定

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)01-0061-07

## The gene chip detection technique for the Mediterranean fly, *Ceratitis capitata*, and its related species (Diptera: Tephritidae)

LI Wen-Fen<sup>1</sup>, YU Dao-Jian<sup>2,\*</sup>, YAN Heng-Mei<sup>1</sup>, LI Jian-Guang<sup>3</sup>, XU Lang<sup>2</sup>, REN Lu-Feng<sup>4</sup> (1. School of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, Guangdong 518010, China; 3. Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China; 4. Vector Gene Technology Company Ltd, Beijing 100176, China)

**Abstract**: The present study established genechip technique for *Ceratitis capitata*, *C. rosa* and *C. cosyra*, in which the mitochondrial cytochrome oxidase I (CO I) gene was used as molecular marker, and the DNA sequences of fruit flies (Diptera: Tephritidae) were used as target sequence. The genechip detection system for fruit flies was composed of detecting probes and quality-control probes for *C. capitata*. The detecting probes included one family probe, one genus probe, three related species probes and four species specific-probes, and the quality-control probes included anchor probe, positive probe, negative probe and blank probe, with one for each. The results of gene chip showed that the specificity of detecting probes was specific to distinguish the three *Ceratitis* fruit flies. The detection method showed good repeatability and stability. The results of different stages (egg, pupa, larva, adult) and different geographical provenances of *C. capitata* were completely consistent. The genechip technique for *Ceratitis* fruit flies provided rapid detection and species identification method to quarantine fruit flies from imported fresh fruits and vegetables in China. Meanwhile, the technique also could be used in detecting other tephritid and related pests in plant quarantine.

**Key words**: Tephritidae; *Ceratitis capitata*; related species; genechip; taxonomic identification

实蝇科 Tephritidae 是双翅目 Diptera 中具有重要经济意义的类群之一, 目前世界已知约有 450 属

4 300 余种 (Norrbon *et al.*, 1999), 其中按实蝇属 *Anastrepha* Schiner、果实蝇属 *Bactrocera* Macqurt、小条

基金项目: 科技部奥运科技(2008)行动计划资助项目(2004BA904B06-6)

作者简介: 李文芬, 女, 1983 年生, 硕士, 主要从事植物检验检疫研究, E-mail: wenfenli@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: yudj08@gmail.com

收稿日期 Received: 2007-07-26; 接受日期 Accepted: 2007-11-13

实蝇属 *Ceratitis* Macleay、寡鬃实蝇属 *Dacus* Fabricius、绕实蝇属 *Rhagoletis* Loew 等 5 个属的多数种类是果蔬作物的重要害虫( White and Elson-Harris, 1992; 汪兴鉴, 1995 )。

地中海实蝇 *Ceratitis capitata*( Wiedeman )是一种对水果和蔬菜最具破坏性的害虫,可以危害几乎所有对人类有价值的水果,被称为“果疏头号杀手”。该害虫原产西非,现已随果蔬等传播到世界 90 多个国家和地区( 梁广勤和姚文国, 1998 )。小条实蝇属 *Ceratitis* 在东亚迄今尚无记录( Wang, 1996 ),该属的部分种类是我国植物检疫禁止进口的检疫性害虫,我国多次在口岸检疫中截获地中海实蝇、芒果小条实蝇 *C. cosyra* 和纳塔尔小条实蝇 *C. rosa* 等多种小条实蝇( 余道坚, 2005 )。因此,开展地中海实蝇及其近缘种的快速准确鉴定,对保护我国农林种植业的安全具有重要的意义。

世界上第一块商业化的基因芯片于 1996 年研制成功( Diamandis, 2000 )。基因芯片基本原理是将核酸片段作为识别分子,按预先设置的排列固定于特定的固相支持载体的表面形成微点阵,利用反向固相杂交技术,将标记的样品分子与微点阵上的核酸探针杂交,以实现多到数万个分子之间的杂交反应,通过特殊的检测系统来高通量、大规模地分析检测样品中多个基因的表达状况或者特定基因分子的存在( 白东亭和祁自柏, 2002 )。基因芯片因具有高通量、高度并行性、高灵敏度等优点而得到了广泛的应用( Schena *et al.*, 2004; 刘玉玲等, 2005 )。我国生物芯片产业从 1997 – 1998 年起步,现主要产品包括基因表达谱芯片、转基因农产品检测芯片、新生儿基因检测芯片、肝炎病毒、艾滋病病毒基因检测芯片,其中肿瘤检测、肝病检测、自身免疫疾病诊断芯片即将或已经进入临床应用和商业化运作( 刘秀珍等, 2007 )。物种鉴定检测芯片研制仍处于起步阶段,如应用于临床致病真菌鉴定( 黄爱华等, 2007 )和水产食品中常见病原微生物鉴定( 高爽等, 2007 )等。但迄今为止,基因芯片技术应用于昆虫鉴定还未见公开报道。

实蝇种类鉴定目前主要依靠培养和直接镜检等形态学鉴定,其操作繁琐、费时,并且需要高度的专业知识。随着分子生物学技术的发展,一些分子学技术也尝试应用于实蝇的种类鉴定,如斑点杂交、RFLP、AFLP 和 PCR 等( Haymer *et al.*, 1992; Kakouli-Duarte *et al.*, 2001; 余道坚等, 2006 ),这些技术或存在检测范围有限( 黄爱华等, 2007 ),尚不能很好满

足快速、准确、高通量检测检疫性实蝇的需要。因此,本研究尝试建立基因芯片技术同时检测地中海实蝇、纳塔尔小条实蝇和芒果小条实蝇的快速检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实蝇标本(卵、幼虫、蛹和成虫)由深圳出入境检验检疫局提供(表 1),实蝇标本放置在  $-4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, DNA 样品放置在  $-40^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中保存。

### 1.2 引物和探针的设计与合成

从 NCBI( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ) GenBank 数据库中获取实蝇科昆虫 mtDNA-CO I 基因序列,用 DNASTAR 软件 MegAlign 程序对其进行比对分析,选择相对保守的区域设计通用引物,在引物的扩增区间找到适于设计探针的所有片段,将候选序列递交到 GenBank 进行 Blast 比对分析,选择理论上通用性和特异性较好的检测探针。质控探针包括定位点探针、阳性对照探针和阴性对照探针,均是实蝇科昆虫 mtDNA-CO I 基因序列无同源性的寡核苷酸片段。引物和探针合成、修饰和标记由北京奥科生物技术有限公司完成。

### 1.3 芯片制备

芯片基片选择晶芯光学级醛基基片(北京博奥生物有限公司)。探针用 50% DMSO 溶解至终浓度为  $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ ,将探针溶液加入 384 孔板中,并按预先设计的探针点阵排布顺序,用芯片点样仪(德国 GeSim 公司)将探针点至基片上。点样后基片经  $37^{\circ}\text{C}$  水合 12 h,用 0.2% SDS 溶液漂洗 5 min;去离子水分别漂洗 3 次,每次 2 min;并放入  $\text{NaBH}_4$  封闭液中漂洗 10 min,中间静置 5 min;去离子水漂洗 3 次,每次 2 min;  $2\text{ }000\text{ r/min}$  离心 2 min,避光保存。用激光共聚焦扫描仪 GenePix 4200A(美国 Axon 公司)对基片进行预扫描质检。

### 1.4 样品制备及标记

**1.4.1 实蝇 DNA 提取:**除实蝇卵之外,单头实蝇标本(幼虫、蛹、成虫)用于基因组 DNA 的提取,采用德国 QIAGEN 公司的 DNeasy Tissue Kit 试剂盒, DNA 提取和模板质量检查方法参照 Yu *et al.*( 2005 )。

**1.4.2 靶基因片段荧光标记 PCR 扩增:**实蝇基因芯片检测荧光标记 PCR 反应在 T3 PCR 仪(德国 Biometra 公司)上进行,反应体系:  $0.25\text{ mmol/L}$   $10\times$  Buffer(  $\text{Mg}^{2+}$  )(大连宝生物)  $0.2\text{ mmol/L}$  CY3-dCTP

表 1 本研究实蝇标本

Table 1 The fruit fly specimens used in this study				
种类 Species	产地 Origin	寄主 Host	虫态 Stages	收集时间 Collecting date
地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i>	南非 South Africa	柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	卵 Egg	2005.09.07
	南非 South Africa	柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	幼虫 Larva	2005.09.07
	南非 South Africa	柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	成虫 Adult	2005.09.07
	美国 USA	不详 Unknown	卵 Egg	2005.09.22
	美国 USA	不详 Unknown	幼虫 Larva	2005.09.22
	美国 USA	不详 Unknown	成虫 Adult	2005.05.18
	意大利 Italy	不详 Unknown	成虫 Adult	2003.06.27
芒果小条实蝇 <i>Ceratitis cosyra</i>	南非 South Africa	芒果 <i>Mangifera indica</i>	幼虫 Larva	2006.06.20
	南非 South Africa	芒果 <i>Mangifera indica</i>	成虫 Adult	2004.11.07
纳塔尔小条实蝇 <i>Ceratitis rosa</i>	南非 South Africa	芒果 <i>Mangifera indica</i>	成虫 Adult	2006.06.19
桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	中国 China	龙眼 <i>Euphoria longan</i>	成虫 Adult	2003.02.06

(Amersham Biosciences 公司) 正向引物和反向引物各 0.2 μmol/L、1 U Taq 酶(大连宝生物) 模板 DNA (包括实蝇 DNA 和阳性质粒模板)10~20 ng,总体积 10 μL。标记 PCR 扩增条件为:94℃ 90 s;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环;72℃ 5 min。

1.5 分子杂交及扫描

分别取 50℃预热的芯片杂交液 10 μL 和 PCR 标记产物 10 μL(实蝇模板扩增产物 8 μL+阳性质粒扩增产物 2 μL),混匀后 95℃变性 5 min。将变性后的产物 20 μL 加入芯片点样区,盖上盖玻片置于湿盒中 46℃避光杂交 3 h。杂交后的芯片依次在洗液 I(0.3×SSC,0.2% SDS)洗液 II(0.06×SSC),各清洗 2 min,2 000 r/min 离心 1 min。芯片用激光共聚焦扫描仪在 532 nm 的激发波长扫描芯片,图像用

GenePix 5.0 软件分析。芯片避光室温保存。

2 结果与分析

2.1 实蝇基因芯片探针

本研究通过筛选,获得能够扩增实蝇科昆虫的通用引物 P3 和 P5(表 2),该引物位于实蝇 mtDNA-COⅠ基因中。在通用引物的扩增区间内根据实蝇属和种之间序列的差异,设计和筛选获得地中海实蝇及其近缘种芯片检测探针 8 条,其中包括实蝇科通用探针 1 条,小条实蝇属通用探针 1 条,地中海实蝇与纳塔尔实蝇、地中海实蝇和非洲芒果实蝇近缘种特异探针各 1 条,以及地中海实蝇、纳塔尔实蝇和非洲芒果实蝇种特异探针 4 条,其中特异检测地中

表 2 实蝇芯片分子标记基因通用引物

Table 2 Conserved primers of gene chip for Tephritid fruit fly				
引物名称 Name	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	长度(nt) Length	正/反向 Forward/Reverse	来源基因 Origin
P <sub>3</sub>	TTTAGTTGACTGGCTACATTACATGG	27	正向 Forward	COⅠ
P <sub>5</sub>	CTGGAGGGGTATTTTGAAGTCATT	24	反向 Reverse	COⅠ

表 3 实蝇生物芯片检测探针

Table 3 Detection probes of gene chip for Tephritid fruit flies				
探针类型 Type	探针名称 Probe name	探针序列(5'-3') Probe sequence(5'-3')	特异性说明 Specificity	
科通用探针 Family probe	teph	AGCAAAGACTGCTCTATTGATAAT	Tephritidae 科通用探针 Tephritidae probe	
属通用探针 Genus probe	cera	AGCTGGTGAGTAGTTTAATTGTG	小条实蝇属通用探针 <i>Ceratitis</i> probe	
近缘种特异探针 Related-species probe	caco	ATAGCTGGGGAATAATTTAATTG	地中海实蝇和芒果小条实蝇近缘种探针 <i>C. capitata</i> and <i>C. cosyra</i> species probe	
近缘种特异探针 Related-species probe	caro	CGTTAAACCTCCAACGTGTAAC	地中海实蝇和纳塔尔小条实蝇近缘种探针 <i>C. capitata</i> and <i>C. rosa</i> species probe	
种特异探针 Species specific probe	ccca-1	AGAACAACGCCCGTTAAACC	地中海实蝇特异探针 <i>C. capitata</i> species specific probe	
种特异探针 Species specific probe	ccca-2	AACAAATCCTGTATGATAGCAAAT	地中海实蝇特异探针 <i>C. capitata</i> species specific probe	
种特异探针 Species specific probe	ccco	CTGTTTAAACCCCCAACTGTGA	芒果小条实蝇特异探针 <i>C. cosyra</i> species specific probe	
种特异探针 Species specific probe	cpro	ACATAATGGAAGTGTGCTACAAC	纳塔尔小条实蝇特异探针 <i>C. rosa</i> species specific probe	

海实蝇的探针有 2 条(表 3)。所有检测探针是一条 20~29 nt 的寡核苷酸,序列为实蝇科、属、种的特异性序列,5'端氨基修饰。实蝇科和小条实蝇属通用探针能够特异检测实蝇科或小条实蝇属昆虫,近缘种探针能够特异检测两个近缘种,地中海实蝇、纳塔尔小条实蝇和芒果小条实蝇种特异性探针可特异检测上述 3 种实蝇。

实蝇基因芯片检测还包括质控探针体系,即定位点探针、阳性对照探针、阴性对照探针和空白对照

等(表 4)。定位点探针是一条 28 nt 的寡核苷酸,与已知序列无同源性,3'端氨基修饰,5'端 Cy3 荧光标记;阳性对照探针是一条 21 nt 的寡核苷酸,与已知序列无同源性,5'端氨基修饰,作用是监控 PCR 扩增标记过程和杂交过程是否正常;阴性对照是一条 23 nt 的寡核苷酸,与已知序列无同源性,5'端氨基修饰,作用是监控杂交过程非特异性结合情况,并作为检测探针位点阳性与否的参照。空白对照以水代替,不含寡核苷酸。

表 4 实蝇基因芯片检测质控探针

Table 4 Quality-control probes of gene chip for Tephritid fruit flies				
类型	代码	序列(5'-3')	长度(nt)	
Type	Code	Sequence(5'-3')	Length	
定位点探针 Anchor point probe	A	TGGATACCCAACTTAGCTATTAATAGTC	28	
阳性对照探针 Positive control probe	P	TGAGACCAACCAACTGAAACG	21	
阴性对照探针 Negative control probe	N	GACTATAGTATAAGCGCGGTCCA	23	
空白对照* Blank control	B	-	-	

\* 空白对照为水对照 Water was set as blank control.

2.2 芯片的阵列设计

在每张基片上分别有 4 个相同的地中海实蝇及其近缘种检测和质控探针点阵,实蝇芯片探针点阵排布如图 1 所示,每个阵列共 4 行 13 列,第 1 列和

第 4 列为定位点探针,其他探针设 3 个重复。上述探针可实现小条实蝇属 *Ceratitis* 昆虫初筛以及地中海实蝇、纳塔尔小条实蝇和芒果小条实蝇的种类鉴定。

A	teph	teph	teph	cera	cera	cera	caco	caco	caco	caro	caro	caro
A	ccca-1	ccca-1	ccca-1	ccca-2	ccca-2	ccca-2	ccco	ccco	ccco	cpro	cpro	cpro
A	P	P	P	N	N	N	B	B	B			
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

图 1 地中海实蝇及其近缘种生物芯片探针排布图

Fig. 1 Layout of gene chip probes for *C. capitata* and the related species  
表中英文缩写说明见表 3 和表 4。Explanation of abbreviations refers to Table 3 and Table 4

2.3 靶基因片段荧光标记 PCR 扩增

分别用地中海实蝇、纳塔尔小条实蝇、芒果小条实蝇、桔小实蝇和为实蝇芯片检测设计的阳性质粒 DNA 模板(一段人工合成的 DNA 片段,5和 3'分别为引物 P3 和 P5 的互补链)进行荧光 PCR 扩增,电泳

检测结果表明,通用引物 P3/P5 能够扩增所有实蝇 DNA 模板和阳性质粒模板,实蝇 PCR 产物序列长度为 450 bp,阳性质粒 PCR 产物序列长度为 120 bp,阴性对照无扩增带(图 2)。

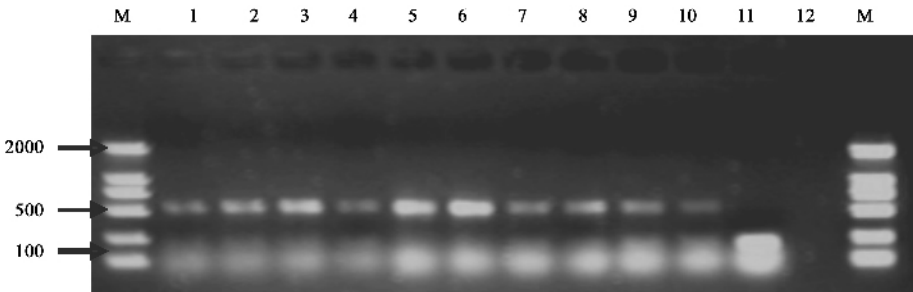


图 2 通用引物 P3/P5 实蝇 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Agarose gelelectrophoresis analysis of PCR products of fruit flies with P3/P5 primers

1-7:地中海实蝇 *C. capitata*. 1:南非,卵 South Africa, egg; 2:南非,蛹 South Africa, pupa; 3:南非,成虫 South Africa, adult; 4:美国,卵 USA, egg; 5:美国,蛹 USA larva; 6:美国,成虫 USA, adult; 7:意大利,成虫 Italy, adult. 8:芒果小条实蝇(南非) *C. cosyra* (South Africa); 9:纳塔尔小条实蝇(南非) *C. rosa* (South Africa); 10:桔小实蝇(广东) *B. dorsalis* (Gangdong); 11:阳性质粒 Plasmid positive; 12:阴性对照 Negative control; M:DL2000 DNA Marker.



2.4 实蝇芯片的特异性杂交实验

荧光标记的 PCR 产物按 1.5 方法进行杂交、处理和扫描。地中海实蝇、纳塔尔实蝇和非洲芒果实蝇 3 种实蝇芯片在 532 nm 的激发波长扫描结果如图 3 所示。所有样品杂交图中阳性对照有杂交信号，阴性对照、空白对照无杂交信号，说明芯片检测体系正常，结果可靠。在通用探针 teph 和 cera 位置 8 个样品都出现杂交信号，可以判定检测样品为实蝇科 Tephritidae 小条实蝇属 *Ceratitis*；近缘种探针 caco 位置只有地中海实蝇和芒果小条实蝇样品有杂交信

号。caco 位置地中海实蝇和纳塔尔小条实蝇样品出现杂交信号；种特异探针 ccca-1、ccca-2 位置仅地中海实蝇有特异杂交信号，ccco 和 cpro 分别是芒果小条实蝇和纳塔尔小条实蝇的种特异探针。

来自南非、美国和意大利等不同地理种群和不同虫态（卵、幼虫、蛹和成虫）的地中海实蝇的芯片杂交结果完全一致（图 3：A ~ E），来自南非的芒果小条实蝇的成虫和幼虫检测结果相同（图 3：F、G），这说明建立的实蝇芯片检测探针具有很好的稳定性。

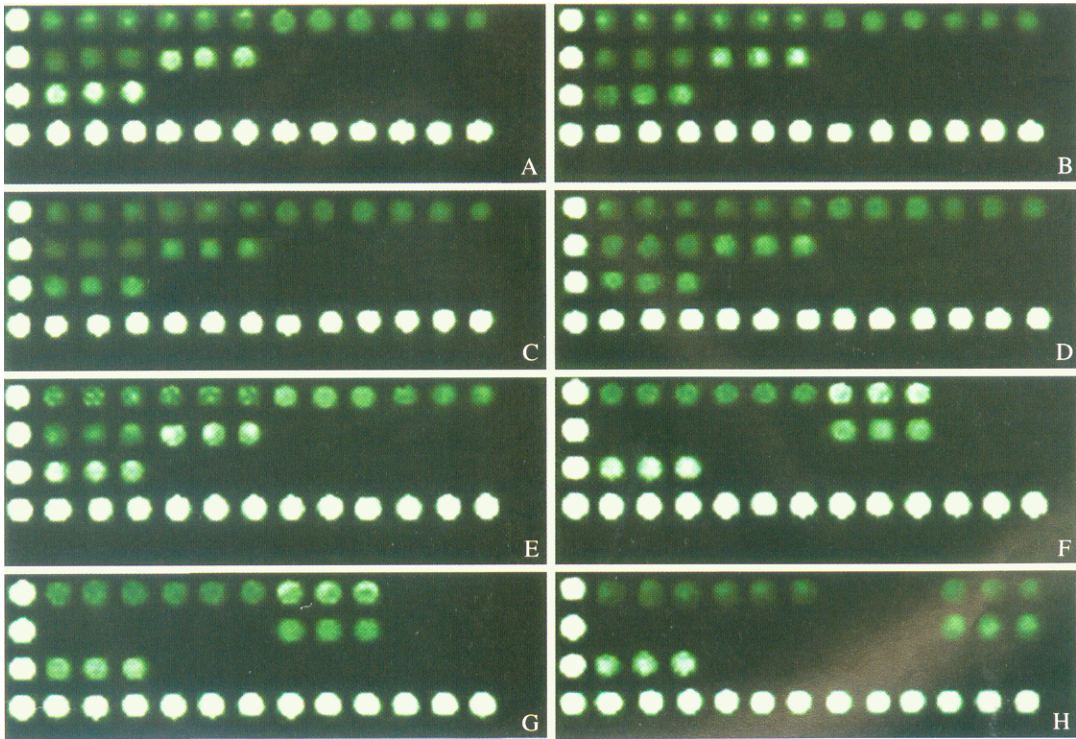


图 3 地中海实蝇及其近缘种芯片杂交扫描结果

Fig. 3 Genechip hybridization results of *C. capitata* and the related species

A - E：地中海实蝇 *C. capitata*。A：南非，成虫 South Africa，adult；B：南非，卵 South Africa，egg；C：美国，卵 USA，egg；D：美国，蛹 USA，pupa；E：意大利，成虫 Italy，adult。F：芒果小条实蝇（南非，成虫）*C. cosyra*（South Africa，adult）；G：芒果小条实蝇（南非，幼虫）*C. cosyra*（South Africa，larva）；H：纳塔尔小条实蝇（南非，成虫）*C. rosa*（South Africa，adult）。

3 讨论

本研究设计的通用引物 P3/P5 来自 mtDNA-COI 基因，可以有效扩增实蝇科按实蝇属 *Anastrepha*、果实蝇属 *Bactrocera*、小条实蝇属 *Ceratitis*、寡鬃实蝇属 *Dacus*、绕实蝇属 *Rhagoletis* 等 5 属近 40 种实蝇（结果未列出），说明引物 P3/P5 对实蝇科昆虫有较好的通用性。由于 mtDNA-COI 基因变异较明显，常用于种间、亚种间及种内亲缘关系的分析与鉴别（徐庆刚和花保祯，2001；施伟和叶辉，2004）。本研究发

现，要在 COI 有限的基因片段中找到科和属通用探针难度较大。筛选的实蝇科探针 teph 分别与按实蝇属、果实蝇属、小条实蝇属、寡鬃实蝇属等数十种实蝇进行杂交，结果均表现较好的通用性（结果未列出）。实蝇科和小条实蝇属通用探针对纳塔尔小条实蝇特异性不如同属的地中海实蝇和芒果小条实蝇强（图 3）。而在昆虫类群中，16S rDNA 和 12S rDNA 基因序列相对保守，更适于高级分类阶元和远缘物种关系的分析和鉴别（Muraji and Nakahara，2001），因此，选择实蝇科昆虫基因芯片检测通用引物还可以重点寻找 16S rDNA 和 12S rDNA 等保守性较好的分

子标记基因。

芯片杂交条件由芯片上 DNA 片段的长短和本身的用途来决定( Lockhart *et al.* ,1996)。本研究在建立实蝇生物芯片检测方法之前,以桔小实蝇 DNA 为模板,对实蝇生物芯片检测的杂交体系如不同的杂交温度、杂交液的盐离子浓度和杂交时间进行了优化(结果未列出),最后筛选结果表明:在实蝇基因芯片检测灵敏度要求相对不高的情况下,采用杂交液 10 × SSPE 2% SDS ;46℃杂交 3 h,芯片检测信号最好。

目前实蝇种类鉴定主要依靠成虫形态学特征,需要较强专业知识,对卵、幼虫和蛹则难于进行准确种类鉴定。分子生物学技术因不受虫态限制正逐步应用到检疫性实蝇的检疫鉴定,如 Haymer 等(1992)选择种特异性重复 DNA 序列作为探针,运用斑点印迹的方法来鉴别地中海实蝇、桔小实蝇和瓜实蝇;地中海实蝇和纳塔尔小条实蝇 AFLP 技术快速鉴定(Kakouli-Duarte *et al.* ,2001);SS-PCR 和 SYBR Green 实时荧光 PCR 技术实蝇快速鉴定(邓中平,2004;余道坚等,2006)等。但上述的分子生物学方法尚不能很好满足进行快速、准确、大规模、高通量检测进境危害性实蝇的需要。基因芯片技术较好地弥补了常规分子检测的缺陷,能一次实现多种害虫的种类初筛和鉴定。本文报道的实蝇生物芯片检测体系,可为我国进口果蔬中地中海实蝇快速筛查和种类鉴定提供有效的技术平台。但实蝇种类繁多,其中检疫性实蝇害虫也多达数十种(余道坚,2005)。随着越来越多的实蝇序列的公开报道,特别是地中海实蝇、油橄榄实蝇和桔小实蝇等 mtDNA 全序列的测定(Nardi *et al.* ,2003;Spanos *et al.* ,2000;Yu *et al.* ,2007),将为实蝇芯片检测提供更合适的分子标记基因和检测探针。

**致谢** 在本项研究中,意大利西耶那大学 Nardi 博士、美国夏威夷大学 Haymer 博士和广东出入境检验检疫局胡学难副研究员赠送实蝇标本;中国科学院动物研究所汪兴鉴研究员、湖南师范大学付秀芹博士审阅初稿并提出宝贵意见,在此一并深致谢意。

## 参 考 文 献 (References)

- Bai DT, Qi ZB, 2002. The application of genechip. *Progress in Microbiology and Immunology*, 30(4): 100–103. [白东亭, 祁自柏, 2002. 基因芯片应用前景. 微生物学免疫学进展, 30(4): 100–103]
- Deng ZP, 2000. Studies on identification of quarantine fruit flies using species-specific primer PCR technique based on mitochondrial DNA. Msc Thesis, Sun Yat-Sen University, Guangzhou. [邓中平, 2000. 检疫性实蝇 mtDNA 特异引物 PCR 鉴定技术的研究. 广州: 中山大学硕士学位论文]
- Diamandis EP, 2000. Sequencing with microarray technology powerful new tool for molecular diagnostics. *Clin. Chem.*, 46(10): 1523–1525.
- Gao S, Xie MJ, Jin DZ, Chao JJ, 2007. Detection and identification for foodborne pathogenic bacteria in fishery products using DNA chip. *Letters in Biotechnology*, 18(1): 72–76. [高爽, 谢明杰, 金大智, 曹际娟, 2007. 运用基因芯片技术建立检测水产食品中常见病原微生物方法的研究. 生物技术通讯, 18(1): 72–76]
- Haymer DS, Mcinnis DO, Arcangeli L, 1992. Genetic variation between strains of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, detected by DNA fingerprinting. *Genome*, 35: 528–533.
- Huang AH, Li JW, Shen ZQ, Jin M, Wang XW, 2007. Detection and identification of fungal pathogens by oligonucleotide microarray hybridization. *Chin. J. Microbiol. Immunol.*, 27(2): 180–185. [黄爱华, 李君文, 谌志强, 金敏, 王新为, 2007. 基因芯片技术检测鉴定临床常见致病真菌的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 27(2): 180–185]
- Kakouli-Duarte T, Casey DG, Burnall AM, 2001. Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae) using amplified fragment-length polymorphism. *J. Econ. Entomol.*, 94(4): 989–997.
- Liang GQ, Yao WG, 1998. Mediterranean Fruit Fly. Beijing: China Agriculture Press. 1–2. [梁广勤, 姚文国, 1998. 地中海实蝇. 北京: 中国农业出版社. 1–2]
- Liu XZ, Zhang RY, Liao HY, Li SC, 2007. Genechip technology and its application. *Binzhou Medical University Journal*, 30(1): 59–60. [刘秀珍, 张如意, 栾海云, 李淑翠, 2007. 基因芯片技术及应用. 滨州医学院学报, 30(1): 59–60]
- Liu YL, Zheng Y, Zhao H, 2005. Preliminary study of human papilloma virus detection and genotyping DNA microarray. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*, 21(7): 411–412. [刘玉玲, 郑英, 赵虎, 2005. 人乳头瘤病毒检测及分型基因芯片制备的初步研究. 中国实用妇科与产科杂志, 21(7): 411–412]
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.*, 14: 1675–1680.
- Muraji M, Nakahara S, 2001. Phylogentic relationships among fruit flies, *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae), based on the mitochondrial rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.*, 10(6): 549–559.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F, 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol. Biol.*, 12: 605–611.
- Norrbom AL, Carroll LE, Thompson FC, 1999. Fruit fly expert system and systematic information database. In: Thompson FC ed. *Systematic Database of Names*. 65–66.
- Schena M (Translated by Zhang L *et al.*), 2004. *Microarray Analysis* (1st ed). Beijing: Science Press. 19–20. [谢纳 M (张亮等译), 2004. 生物芯片分析(第1版). 北京: 科学出版社. 19–20]
- Shi W, Ye H, 2004. Genetic differentiation in five geographic populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera:

Tephritidae) in Yunnan province. *Acta Entomol. Sin.*, 47( 3 ): 384 – 388. [ 施伟, 叶辉, 2004. 云南桔小实蝇五个地理种群的遗传分化研究. *昆虫学报* 47( 3 ): 384 – 388 ]

Spanos L, Koutroumbas G, Kotsyfakis M, Louis C, 2000. The mitochondrial genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.*, 9 : 139 – 144.

Wang XJ, 1995. Identification of harmful fruit fly in the vegetable and fruit. *Plant Quarantine*, 9( 2 ): 84 – 85. [ 汪兴鉴, 1995. 五种重要果蔬类有害实蝇属的鉴定. *植物检疫*, 9( 2 ): 84 – 85 ]

Wang XJ, 1996. The fruit flies ( Diptera : Tephritidae ) of the East Asian Region. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 21( Suppl. ): 1 – 338.

White IM, Elson-Harris MM, 1992. Fruit flies of economic significance : their identification and bionomics. CAB International, Wallingford. 601 – 602.

Xu QG, Hua BZ, 2001. Application of mtDNA in phylogenetic analysis of insects. *Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry ( Natural Science )*, 29( Suppl. ): 79 – 83. [ 徐庆刚, 花保祯, 2001. 线粒体 DNA 在昆虫系统学研究中的应用. *西北农林科技大学学报( 自然科学版 )*, 29( 增刊 ): 79 – 83 ]

Yu DJ, 2005. Study on rapid identification of quarantine fruit fly ( Diptera : Tephritidae ) based on molecular techniques. PhD Dissertation, Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai. [ 余道坚, 2005. 检疫性实蝇分子生物学快速鉴定技术的研究. 上海 : 中国科学院研究生院学位论文 ]

Yu DJ, Chen ZL, Zhang RJ, Yin WY, 2005. Real-time qualitative PCR for the inspection and identification of *Bactrocera philippinensis* and *Bactrocera occipitalis* ( Diptera : Tephritidae ) using SYBR Green assay. *Raffles Bull. Zool.*, 53 : 73 – 108.

Yu DJ, Xu L, Nardi F, Li JG, Zhang RJ, 2007. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the oriental fruit fly, *B. dorsalis* ( Diptera : Tephritidae ). *Gene*, 396( 1 ): 66 – 74.

Yu DJ, Zhang GM, Chen ZL, Kang L, Yang WD, 2006. Rapid identification of *Bactrocera latifrons* by real-time PCR using SYBR Green chemistry. *Plant Quarantine*, 22( 1 ): 10 – 13. [ 余道坚, 章桂明, 陈志舜, 康林, 杨伟东, 2006. SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定辣椒实蝇. *植物检疫*, 22( 1 ): 10 – 13 ]

( 责任编辑 : 袁德成 )